

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТОКОЛА ЦТАБ-PVP- МЕРКАПТОЭТАНОЛ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ БОГАТЫХ ПОЛИФЕНОЛАМИ И ПОЛИСАХАРИДАМИ

К.И. Жатько, Е.Р. Коршун, М.В. Пасовец, Т.М. Гуринович

Научный руководитель – Н.В. Водчиц, м.н.с.

Научный консультант – А.А. Волотович, к.б.н., доцент

Полесский государственный университет

Введение. Общей проблемой высших растений при выделении ДНК являются различные загрязняющие вещества, например, полисахариды и полифенолы [1, с. 3]. Физико-химические свойства подобных веществ в определенной степени совпадают со свойствами нуклеиновых кислот, что затрудняет их полное отделение от ДНК и обуславливает низкое качество препаратов, что делает непригодным их дальнейшее использование [2, с. 148]. Получение качественного препарата суммарной ДНК и устранение ингибирующих веществ для растений рода *Vaccinium* удалось с помощью протокола «ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол» [3, с. 29].

Целью данной работы была возможность применения данной методики для выделения ДНК из растительных тканей рододендрона вечнозеленого, малины обыкновенной и, для сравнения, двух сортов голубики высокой, а так же определение ее качества для молекулярно-генетических исследований.

Методика и объекты исследования. Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического факультета учреждения образования “Полесский государственный университет” (далее БТФ ПолесГУ). Использовали ткани разных органов растений (стебель и лист) сортов голубики высокой ‘Toro’, ‘Bluegold’, малины обыкновенной сорт ‘Polana’ и рододендрона вечнозеленого произ-

веденных методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ.

ДНК выделяли протоколом «ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол» [3, с. 26]. Оценку эффективности выделения ДНК из листьев и стеблей растений проводили, используя электрофоретическое разделение полученного продукта в агарозном геле, спектрофотометрическое определение концентрации и чистоты образцов, а также ISSR-ПЦР-анализ.

Длину фрагментов выделенной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза экстракта с загрузочным красителем, наносимых в 0,8% агарозный гель, в трис-боратном буфере, при напряжении 80–90 V, в течение 30 мин.

Измерение концентрации ДНК проводили по стандартной методике по объему 1,5 мкл полученного экстракта в 1–3 повторностях на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длин волн 220–350 нм

Реакционная смесь для проведения ПЦР готовилась в объеме 25 мкл и включала стандартные компоненты. Полимеразные цепные реакции проводились на термоциклере Biometra [4, с. 116].

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле, в трис-боратном буфере, при напряжении 60 V – 180 мин. Для определения длины фрагментов ДНК использовали размерные маркеры 100 bp DNA Ladder (производства Thermo Scientific, Литва). Визуализация результатов электрофореза проводилась в приборе гель-документирования Quantum ST4.

Результаты и их обсуждение. Анализ ДНК, полученной протоколом «ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол» показал, что соотношение поглощения при 260/280 нм, в среднем, равно 1.80. Это свидетельствует о том, что полученные образцы ДНК не содержат примесей. Наивысшая концентрация ДНК из зеленых листьев голубики высокой равна 73.4 нг/мкл, наименьшая – 22.1 нг/мкл; из стебля соответственно: 140.7 нг/мкл и 33.8 нг/мкл. Наивысшая концентрация ДНК из листьев малины садовой равна 154.3 нг/мкл, из листа рододендрона 57.1 нг/мкл, наименьшая – из малины 122.5 нг/мкл, из рододендрона 21.0 нг/мкл. Наибольшая концентрация ДНК из стебля малины равна 75.0 нг/мкл, из стебля рододендрона 77.9 нг/мкл, а наименьшая 38.1 нг/мкл у малины и 59.8 нг/мкл у рододендрона. Суммируя вышесказанное, можно заключить, что в отличии от малины, у рододендрона и голубики концентрация ДНК, выделенной из стебля, выше, чем из листа.

Для выявления степени деградации молекул в препарате дезоксирибонуклеиновой кислоты использовали электрофоретический анализ. Выделенная ДНК из всех исследуемых образцов при визуализации на агарозном геле светилась в виде яркой компактной полосы высокой молекулярной массы.

В дальнейшем была проведена амплификация ДНК всех образцов с использованием ISSR-праймера UBC 845 [4 с. 117]. Проведенный ПЦР-анализ показал хорошую воспроизводимость результатов, что, в свою очередь, свидетельствует о высоком качестве выделенной ДНК. На электрофореграмме наблюдалось отсутствие шмера, во всех пробах были видны продукты амплификации, что говорит о полном удалении ингибиторов. На профилях светились яркие, отчетливые фрагменты, основная зона разделения которых расположена в диапазоне от 880 до 170 п.н. Число маркеров варьировало от 7 у рододендрона вечнозеленого до 11 у сорта Того голубики высокой.

Выводы. Методика «ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол» позволяет получить чистый препарат ДНК без признаков деградации и примесей у растений богатых полифенолами и полисахаридами. Экспериментально установлено, что лучшие результаты получаются при выделении ДНК из стебля у сортов голубики высокой и рододендрона вечнозеленого; из молодого листа у малины обыкновенной. Средний коэффициент абсорбции при длине волны A260/A280 нм равнялся 1.80. При этом количество ДНК варьировало в пределах 21.0 – 154.3 нг/мкл.

Использование выделенной ДНК в качестве матрицы в ISSR-ПЦР-анализе позволило получить воспроизводимые электрофоретические профили с количеством фрагментов от 7 до 11, зона разделения которых расположена в диапазоне от 880 до 170 п.н.

Список использованных источников

1. Звягин, А.С. Выделение ДНК из листьев *Vitis vinifera* L. / А.С. Звягин, Л.П. Трошин // Научный журнал КубГАУ. – 2010. – № 60 (06). – С.1–17.
2. Калаев, В.Н. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* / В.Н. Калаев, О.А. Землянухина, И.Ю. Карпеченко, К.А. Карпеченко, А.М. Кондратьева, В.Н. Вепринцев, Н.А. Карпеченко, С.С. Карпова // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5. – С. 148–152.

3. Водчиц, Н.В. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н.В. Водчиц, Е.О. Юрченко, И.О. Зайцева, И.Г. Кирикович, А.А. Волотович // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2014. – № 2. – С.25–30.

4. Водчиц, Н.В. Применение ISSR-маркеров для генетической паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium* / Н.В. Водчиц // Весці НАНБ. Сер. біял. навук – 2016. – № 3. – С. 115–120.